

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06090793 A**

(43) Date of publication of application: **05.04.94**

(51) Int. Cl

C12Q 1/04
C12M 1/34
C12N 15/10
C12N 15/11
C12Q 1/68

(21) Application number: **04113154**

(22) Date of filing: **07.04.92**

(71) Applicant: **TAKARA SHUZO CO LTD**

(72) Inventor: **SHIMADA MASAMITSU**
FUJINO KIMIYA
KATOU IKUNOSHIN

(54) DETECTION OF LACTOBACILLUS BACTERIA

(57) Abstract:

PURPOSE: To provide a gene specific to Lactobacillus bacteria, a method for quickly detecting said bacteria in high sensitivity using the gene, and a kit therefor.

CONSTITUTION: The objective method for detecting Lactobacillus bacteria, designed to detect a gene in the spacer region lying in between the gene coding 16SrRNA of the Lactobacillus bacteria and the gene coding 23SrRNA thereof. The second objective gene resting on the spacer region. The third objective kit for detecting said

bacteria containing a specific primer for proliferating the second objective gene. The present method is especially effective for detecting hiochi bacteria.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-90793

(43)公開日 平成6年(1994)4月5日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/04	Z N A	6807-4B		
C 1 2 M 1/34	B			
C 1 2 N 15/10				
15/11		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求 請求項の数3(全 14 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-113154

(22)出願日 平成4年(1992)4月7日

(71)出願人 591038141

寶酒造株式会社

京都府京都市伏見区竹中町609番地

(72)発明者 瀧田 雅光

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
株式会社中央研究所内

(72)発明者 富士野 公也

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
株式会社中央研究所内

(72)発明者 加藤 郁之進

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造
株式会社中央研究所内

(74)代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)

(54)【発明の名称】 ラクトバチルス属細菌の検出方法

(57)【要約】

【目的】 ラクトバチルス属細菌に特異的な遺伝子を提供し、それを用いて該細菌を迅速、且つ高感度に検出する方法及びキットを提供する。

【構成】 ラクトバチルス属細菌の16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間にあるスペーサー領域の遺伝子を検出する該細菌の検出方法。該スペーサー領域の遺伝子。該遺伝子を増幅させるための特定のプライマーを含有する該細菌の検出キット。特に大腸菌の検出に有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラクトバチルス属細菌の検出方法において、ラクトバチルス属細菌の16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間にあるスペーサー領域の遺伝子を検出することを特徴とするラクトバチルス属細菌の検出方法。

【請求項2】 請求項1記載のスペーサー領域の遺伝子。

【請求項3】 請求項1記載の方法を用いて検出を行うための検出キットであって、ラクトバチルス属細菌の請求項2記載のスペーサー領域の遺伝子を増幅させるための特定のプライマーを含有していることを特徴とするラクトバチルス属細菌検出キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ラクトバチルス(*Lactobacillus*)属細菌の検出方法に関し、更に詳細には16S/23S rRNAスペーサー領域の遺伝子領域を用いた迅速かつ高感度な火落菌等の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】清酒の火落ちを起こす微生物(火落菌)に関する研究は、北原や野白、百瀬によって分類学的研究が行われている(日本醸造協会雑誌、第65巻、第715～803頁、(1970))。火落菌はラクトバチルス属に属し、メバロン酸の要求性から真性火落菌と火落性乳酸菌に分類される。真性火落菌には、ラクトバチルスヘテロヒオチイ(*Lactobacillus heterohiochii*)とラクトバチルスホモヒオチイ(*Lactobacillus homohiochii*)があり、火落性乳酸菌には、ラクトバチルスジャポニカス(*Lactobacillus japonicus*)、ラクトバチルスプラントラム(*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチルスカゼイ(*Lactobacillus casei*)等が挙げられる。火落菌の検出は、火落菌検出培地S1培地(日本醸造協会)が市販されており、本培地を用いた培養法により検出が行われている。しかし、この検出法には7日間以上の日数を要する。したがって、火落菌の迅速高感度検出法が望まれている。微生物やウイルスの迅速高感度検出法としてPCR法[メソッズ イン エザイモロジー(*Methods in Enzymology*)、第155巻、第335～350頁(1987)]がある。PCR法は、検出する生物の遺伝子の特異的な塩基配列を指数的に増幅させる方法である。PCR法を用いるには検出する生物の遺伝子情報が必要である。

【0003】ラクトバチルス属細菌のrRNA遺伝子については、ラクトバチルスブレビス(*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルスデルブルエキイ(*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバチルスプラントラム、及びラクトバチルスビリデセンシス(*Lactobacillus viridescens*)の5S rRNA遺伝子の塩基配列が明らかにされており[ジャーナル オブ モレキュラー

エボリューション(*Journal of Molecular Evolution*)、第8巻、第143～153頁(1976)、ヌクレイック アシッズ リサーチ(*Nucleic Acids Research*)、第17巻、第4873頁(1989)、同第16巻、第10938頁(1988)、同第8巻、第979～987頁(1980)]、ラクトバチルス カゼイ、ラクトバチルス カンドレリ(*Lactobacillus kandleri*)、ラクトバチルス マイナー(*Lactobacillus minor*)、ラクトバチルス コンフサス(*Lactobacillus confusus*)、
10 ラクトバチルス ビリデセンシス、ラクトバチルス カテナホルメ(*Lactobacillus catenaforme*)、及びラクトバチルス ビツリナス(*Lactobacillus vitulinus*)の16S rRNA遺伝子の塩基配列が明らかにされている[ジャーナル オブ バクテリオロジー(*Journal of Bacteriology*)、第171巻、第6455～6467頁(1989)、ヌクレイック アシッズ リサーチ 第18巻、第3401～3402頁(1990)、システムティック アンド アプライド ミクロバイオロジー(*Systematic and Applied Microbiology*)、第12
20 巻、第145～149頁(1989)]。そして土屋らはラクトバチルス プレビスの5S rRNA遺伝子の塩基配列をもとにプライマーを作製し、PCR法を用いたビール中のラクトバチルス プレビスの検出方法を報告している[日本醸造協会雑誌、第86巻、第720頁(1991)]。しかし、5S rRNAの塩基配列は微生物の属を越えて極めて類似しているため、ラクトバチルス プレビス以外の微生物をも誤って検出してしまう可能性がある。また、16S rRNAについても同様に、微生物の属を越えて極めて類似しているため、ラクトバチルス属細菌を特異的に検出する目的には不適當である。
30

【0004】一方、16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子の間に構成されているスペーサー領域の遺伝子は、微生物種に特異的な塩基配列を有することが知られているが、ラクトバチルス属細菌のスペーサー領域の塩基配列は明らかにされていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、ラクトバチルス属細菌に特異的な塩基配列の遺伝子を提供し、その配列を用いて、ラクトバチルス属細菌、特に火落菌の迅速、且つ高感度な検出方法及びそれに用いるキットを提供することにある。
40

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明を概説すれば、本発明の第1の発明はラクトバチルス属細菌の検出方法に関し、ラクトバチルス属細菌の16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間にあるスペーサー領域の遺伝子を検出することを特徴とする。また、本発明の第2の発明は、第1の発明のスペーサー領域の遺伝子に関する。また、本発明の第3の発明
50

は、第1の発明の方法を用いて検出を行うための検出キットであって、ラクトバチルス属細菌のスペーサー領域の遺伝子を増幅させるための特定のプライマーを含有していることを特徴とする。

【0007】ラクトバチルス（以下、L. と略称する）属細菌のrRNAをコードするDNAは、16SrRNA-スぺーサー領域-23SrRNA-スぺーサー領域-5SrRNAの各DNA配列で構成されている。本発明

表 1

(真性火落菌)

L. ヘテロヒオチイ

L. ホモヒオチイ

(火落性乳酸菌)

L. ジャポニカス

L. プランタルム

L. カゼイ サブスピーシーズ

ラムノサス (rhamnosus)

L. カゼイ サブスピーシーズ カゼイ

L. スピーシーズ

(一般乳酸菌)

L. プレビス

(火落菌単離株)

【0009】培地組成：

SI : SI 培地 (日本醸造協会) 5g、エタノール10ml、蒸留水90ml

803 : 0.5%ポリペプトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%グルコース、0.2%ラクトース、0.05%ツイーン(Tween) 80、0.1%MgSO₄/7H₂O、pH6.8~7.0

804 : 0.5%ペプトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%グルコース、0.1%MgSO₄/7H₂O、pH6.6~7.0

【0010】次に、遺伝子検出方法として現在最も高感度で簡便なPCR法を行うために、L. 属細菌に共通な ※

表 2

R16-1の配列：5'-CTTGTAACACACCGCCCGTCA-3'

L. カゼイ

バチルス ズブチリス

(Bacillus subtilis)

エシエリヒア コリ

(Escherichia coli)

マイコバクテリウム ボビス

(Mycobacterium bovis)

ハロバクテリウム ハロビ

ウム(Halobacterium halobium)

* 明者らは前記課題を解決するために表1に示した13種類のL. 属細菌のrRNAをコードしているDNA配列の一部、すなわち16SrRNA-スぺーサー領域-23SrRNAをコードしているDNA配列の一部を明らかにし、次にL. 属細菌一般に共通なDNA配列及びそれぞれの種に特異的なDNA配列を見出した。

【0008】

【表1】

菌 株 培地 培養温度

IF013118 SI 30℃

IF013119 SI 30℃

JCM1198 SI 30℃

IF013120 SI 30℃

IF013121 SI 30℃

JCM1199 SI 30℃

IAM10068 803 37℃

IAM1216 803 37℃

IF03532 804 37℃

IF03533 804 37℃

IF03954 804 37℃

IF013110 804 30℃

F-1 SI 30℃

※ DNA配列及び種に特異的なDNA配列の特定領域DNAをPCR法で増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。次に各L. 属細菌DNAを鋳型としてPCR法を行い、L. 属細菌DNAの特定領域が効率よく増幅、検出されること、及び各細菌が特異的に検出できることを見出し本発明を完成した。

【0011】以下、具体的に本発明を説明する。16SrRNA及び23SrRNAをコードする遺伝子は微生物間でよく保存されていることが知られている(表2~表5)。

【0012】

【表2】

30

50

5

6

マイコプラズマ カプリコ	-----
ラム(Mycoplasma capricolum)	
シュードモナス アエルギ	-----
ノサ(Pseudomonas aeruginosa)	
サーマス サーモフィラス	-----
(Thermus thermophilus)	
ハロコッカス モールアエ	----- C -----
(Halococcus morrhuae)	
ストレプトミセス リビダ	-----
ンス(Streptomyces lividans)	
ヘリオバクテリウム クロ	-----
ラム(Heliobacterium chlorum)	
フラボバクテリウム ヘパリ	-----
ナム(Flabobacterium	
heparinum)	

【0013】

【表3】

表 3

R16-2の配列: 5'-G T G C G G C T G G A T C A C C T C C T-3'

L. カゼイ	N N N N N N N N -----
バチルス ズブチリス	-----
エシェリヒア コリ	C ----- T -----
マイコバクテリウム ボビス	-----
ハロバクテリウム ハロビ	C -----
ウム	
マイコプラズマ カプリコ	----- A -----
ラム	
シュードモナス アエルギ	C -----
ノサ	
サーマス サーモフィラス	-----
ハロコッカス モールアエ	C -----
ストレプトミセス リビダ	-----
ンス	
ヘリオバクテリウム クロ	-----
ラム	
フラボバクテリウム ヘパリ	- N N N N N N N N -----
ナム	

【0014】

【表4】

表 4

R23-1Rの配列: 3'-C $\begin{smallmatrix} C \\ T \end{smallmatrix}$ T A C $\begin{smallmatrix} G \\ C \end{smallmatrix}$ G A A C C G T G A T C C T C-5'

R23-1Rの相補配列: 5'-G $\begin{smallmatrix} G \\ A \end{smallmatrix}$ A T G $\begin{smallmatrix} C \\ G \end{smallmatrix}$ C T T G G C A C T A G G A G-3'

バチルス	ズブチリス	- G - - - C - - - - - - - - - - - - - - - - -
エシェリヒア	コリ	- G - - - C - C - - - - - G - C A - - - -
マイコバクテリウム	ボビス	- G - - - C - - - - - - - T C G A - - - -
ハロバクテリウム	ハロビウム	- G - - A G - - C - - - T - G G A T G C
マイコプラズマ	カプリコラム	- A - - - C - - - - - A - A A T - - - -
シュードモナス	アエルギノサ	- G - - - C - - - - - - G - C A - - - -
サーマス	サーモフィラス	- G - - - C - - C - - - - C C * - - - -
ハロコッカス	モールアエ	- A - - A G - - - - - - G - C A - - - -

【0015】

【表5】

表 5

R23-2Rの配列: 3'-C T T T G T A G A T T C A T G G G C C T-5'

R23-2Rの相補配列: 5'-G A A A C A T C T A A G T A C C C G G A-3'

バチルス	ズブチリス	- - - - - - - - - - - - - - - - -
エシェリヒア	コリ	- - - - - - - - - - - - - C - -
ハロバクテリウム	ハロビウム	- - - G - - - - - C - - - - - G G C C -
シュードモナス	アエルギノサ	- - - - - - - - - - - - - T - -
サーマス	サーモフィラス	- - - - - - - - - C - - - - - A - -
ハロコッカス	モールアエ	- - - - - - - - - C - - - - - G - C -

【0016】上記表2～表5は原核生物 rRNA 遺伝子の保存されている塩基配列、及びそれらから選定したプライマーの塩基配列を示すものであり、表2及び表3は16S rRNA 遺伝子の、表4及び表5は23S rRNA 遺伝子の、それぞれ保存されている塩基配列、及びそれらから選定したプライマーの塩基配列を表す。表2～表5ではいずれも、保存されている塩基を—で、異なる塩基をその塩基の記号で、欠損している塩基を*で、同定されていない塩基をNで示した。

【0017】例えば、配列表の配列番号1で表されるR16-1プライマーと配列番号4で表されるR23-2Rプライマーの組合せ、配列番号2で表されるR16-2プライマーと配列番号3で表されるR23-1Rの組合せでL. 属細菌のスペーサー領域をPCR法で増幅することができる。

【0018】これらのプライマーはDNA合成機により合成することができ、HPLC等で適宜精製して使用す * 50

ることができる。

【0019】PCR法については、タックDNAポリメラーゼを含む遺伝子増幅キット及び自動遺伝子増幅装置が宝酒造社から市販されている。PCR法により増幅されたスペーサー領域を含む断片を含む塩基配列を決定するためには、例えば増幅断片をM13ファージベクターにクローニングし、ファージDNAを調製した後、サンガー法により決定することができる。

【0020】このようにして決定したスペーサー領域の塩基配列は、例えばDNASISシステム（宝酒造社）を用いて解析することができ、L. 属細菌のそれぞれの種に特異的領域、あるいは共通する領域を検索することができる。本発明者らは、13種類のL. 属細菌のスペーサー領域の塩基配列を明らかにし、配列表の配列番号5～13に示されるL. 属細菌に特異的な塩基配列を決定した。配列表の配列番号5はL. ヘテロヒオチイ JCM1198とL. ホモヒオチイ JCM1199、

配列番号6はL. ヘテロヒオチイ IFO13118、
L. ヘテロヒオチイ IFO13119、L. ホモヒオチイ
IFO13120、及びL. ホモヒオチイ IFO13121、配列番号7はL. ジャポニカス IAM10068、配列番号8はL. プラントルム IAM1216、配列番号9はL. カゼイサブスピーシーズ ラムノサス IFO3532、配列番号10はL. カゼイサブスピーシーズ カゼイ IFO3533、配列番号11はL. スピーシーズ IFO3954、配列番号12はL. プレビス IFO13110、配列番号13は清酒より新たに分離した火落菌分離株F-1のrRNAをコードしている遺伝子の塩基配列である。

*

表 6

菌 株	特異的配列	特異的プライマー
L. ヘテロヒオチイ IFO13118	配列番号 6	LAM3R (配列番号15)
IFO13119	" 6	LAM3R (" 15)
JCM1198	" 5	LAK4R (" 14)
L. ホモヒオチイ IFO13120	" 6	LAM3R (" 15)
IFO13121	" 6	LAM3R (" 15)
JCM1199	" 5	LAK4R (" 14)
L. ジャポニカス IAM10068	" 7	LAJ3R (" 16)
L. プラントルム IAM1216	" 8	LAJ3R (" 16)
L. カゼイ サブスピーシーズ ラムノサス IFO3532	" 9	LAC4R (" 17)
L. カゼイ サブスピーシーズ カゼイ IFO3533	" 10	LAC4R (" 17)
L. スピーシーズ IFO3954	" 11	LAB4R (" 18)
L. プレビス IFO13110	" 12	LAB4R (" 18)
火落菌単離株 F-1	" 13	LAF 1 (" 19)

【0023】具体的に説明すれば、配列表の配列番号20で表されるLAU1と配列番号14で表されるLAK4Rのプライマー対によりL. ヘテロヒオチイ JCM1198とL. ホモヒオチイ JCM1199の遺伝子が、LAU1と配列番号15で表されるLAM3Rのプライマー対によりL. ヘテロヒオチイ IFO13118、13119とL. ホモヒオチイ IFO13120、13121の遺伝子が、LAU1と配列番号16で表されるLAJ3Rのプライマー対によりL. ジャポニカス IAM10068とL. プラントルム IAM1216の遺伝子が、LAU1と配列番号17で表されるLAC4Rのプライマー対によりL. カゼイ サブスピーシーズ ラムノサス IFO3532とL. カゼイ サブスピーシーズ カゼイ IFO3533の遺伝子が、LAU1と配列番号18で表されるLAB4Rのプライマー対によりL. スピーシーズ IFO3954とL. プレビス IFO13110の遺伝子が、配列番号19で表されるLAF1と配列番号21で表されるLA

※50

*【0021】得られた塩基配列を基にDNASISシステム（宝酒造社）を用いてそれぞれのL. 属細菌の特異的な配列及び共通する配列を解析することができる。その結果、配列表の配列番号14～21に示される特異的配列及び共通配列が得られた。これらの配列をPCR法のプライマーとして用いれば、それぞれのL. 属細菌DNAを特異的に増幅することができる。あるいは一對の共通プライマーですべてのL. 属細菌DNAを増幅することができる。表6にそれぞれの菌株とスペーサー領域を含む特異的配列、特異的プライマーの関係を示した。

【0022】

【表6】

※U3Rのプライマー対により単離株F-1の遺伝子が特異的に増幅され、各菌を特異的に検出することができる。また、LAU1とLAU3Rのプライマー対によりこれらすべてのL. 属細菌の遺伝子が増幅され、これらの菌を検出することができる。なお、L. 属細菌においてはスペーサー領域にtRNAをコードする領域が挿入されている場合があるが、この場合でもこれらのプライマーを用いて増幅、検出できることに変わりはなく、本発明に含まれる。

【0024】増幅後のL. 属細菌DNAの検出は、例えばアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、スポット法、及びサザンブロット法を用いて行うことができる。なお、スポット法、サザンブロット法の際は増幅領域内でプローブDNAを選択すればよい。

【0025】また、本発明に従って、L. 属細菌特定DNA領域を増幅させるためのプライマー対をそろえてキットしておくことにより、L. 属細菌の検出を簡便に行うことができる。なお、キットに用いる試薬は溶液状で

も良いし、凍結乾燥物でもよい。

【0026】なおまた、未知の原核生物のスペーサー領域をPCR法で増幅し、その塩基配列を決定することにより、その原核生物を同定することができる。プライマーとしては、例えば前述のR16-1、R16-2、R23-1R、R23-2Rを使用することができる。

【0027】以上PCR法を用いたL. 属細菌の高感度検出法について詳細に説明してきたが、本発明はPCR法に限定されるものではなく、特定のDNA及びその相補鎖を高感度に検出する方法はすべて本発明に含まれるものであり、例えばQ β -レプリケース アンプリフィケーション システム [バイオ/テクノロジー(Bio/technology)、第6巻、第1197頁(1988)] による方法が挙げられる。

【0028】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

【0029】実施例1

L. 属細菌の16S/23SrRNAスペーサー領域のクローニング及び塩基配列の決定

(1) L. 属細菌のゲノムDNAの調製

表1に示したL. 属細菌をSI、803、あるいは804液体培地15ml中で30℃あるいは37℃、4~7日間培養した。培養後、3500rpm、10分間遠心し集菌した。菌を0.5mlの50mM Na-リン酸バッファー(pH7)に懸濁し、5 μ lの10mg/ml N-アセチルムラミダーゼ(生化学工業社)を加え、37℃、2時間反応させた。続いて、5 μ lの10mg/mlプロテイナーゼK及び5 μ lの10mg/mlプロナーゼEを加え、37℃、2時間反応させた。更に、25 μ lの10%SDSを加え37℃、30分間反応させた。反応後、0.5mlのフェノール/クロロホルム(等量混合液)を加え緩やかに混合し、12000rpm、10分間遠心し水層(上層)を回収した。次に、0.5mlのクロロホルムを加え緩やかに混合し、12000rpm、10分間遠心し水層(上層)を回収した。最後に、1mlのエタノールを加え、12000rpm、10分間遠心し沈殿を回収した。沈殿は80%エタノールにて洗浄し、乾燥後、100 μ lのTEバッファー[10mMトリス(Tris)-HCl、(pH8.0)、1mM EDTA]に溶解した。この結果、それぞれの菌のゲノムDNA10 μ gが得られた。

【0030】(2) オリゴヌクレオチドプライマーDNAの合成及び精製

表2~表5に示したオリゴヌクレオチドプライマーDNAをDNA合成機(アプライドバイオシステムズ社)を用いて合成し、脱保護の後、イオン交換HPLC(TSKゲル、DEAE-2SWカラム、東ソー社)セブパック(Sep-pack)C18(ウォータース社)で精製、脱塩し、各DNA約50 μ gを得た。

【0031】(3) PCR法によるスペーサー領域の増幅

実施例1-(1)で調製したそれぞれの菌株のゲノムDNA0.1 μ gを0.5ml用チューブ(バイオビック社)に取り、94℃、10分間加熱処理した後、ジーン

アンプ キット(Gene Amp Kit)(宝酒造社)中の100 μ lの10 \times 増幅用バッファー[100mMトリス-HCl、(pH8.3)、500mM KCl、15mM MgCl₂、0.1%(W/V)ゼラチン]、16 μ lの

1.25mM dNTP混合液(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、0.5 μ lの5ユニット/ μ lのタック-ポリメラーゼ、1 μ lの20 μ M R16-1プライマー、1 μ lの20 μ M R23-2Rプライマー、あるいはR16-1とR23-2Rの代りに1 μ lの20 μ M R16-2プライマー、1 μ lの20 μ M R23-1Rプライマーを加え、これに滅菌水を加えて100 μ lの溶液にした。この反応液は上層に100 μ lのミネラルオイル(シグマ社)を加えた後、自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラー(宝酒造社)により増幅反応を行った。反応条件は、94℃、0.5分間の変性→55℃、2分間のプライマーのアニーリング→72℃、2分間の合成反応のサイクルを30サイクル行った。反応後10 μ lの反応液を取り、ヌシーブ(NuSieve)3:1アガロース(FMC社)ゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、増幅されたDNAを確認した。その結果、それぞれの菌株のゲノムDNAからR16-1とR23-2Rのプライマーにより約570~590bpのDNAが増幅され、R16-2とR23-1Rのプライマーにより約270~290bpのDNAが増幅された。

【0032】(4) スペーサー領域のクローニング及びシーケンシング

実施例1-(3)で得られた増幅DNA反応液90 μ lを90 μ lのフェノール/クロロホルム(等量混合液)を加え緩やかに混合し、12000rpm、10分間遠心し水層(上層)を回収した。次に、90 μ lのクロロホルムを加え緩やかに混合し、12000rpm、10分間遠心し水層(上層)を回収した。最後に、9 μ lの3M酢酸ナトリウムと180 μ lのエタノールを加え、12000rpm、10分間遠心し沈殿を回収した。沈殿は80%エタノールにて洗浄し、乾燥後、8 μ lのTEバッファーに溶解した。この溶液にブラントニングキット(宝酒造社)に含まれる1 μ lの10 \times バッファーと1 μ lのT4DNAポリメラーゼを加え、37℃、5分間反応させ、増幅DNAの末端平滑化を行った。反応は94℃、10分間加熱処理し停止した。次に、この反応液にメガラベルキット(宝酒造社)に含まれる2 μ lの10 \times リン酸化バッファー、1 μ lのT4ポリヌクレオチドキナーゼ、2 μ lの10mM ATP及び5 μ lの蒸留水を加え、37℃、30分間リン酸化反応を行った。反

応液は1%シーブラーク(Sea Plaque)アガロース(FMC社)電気泳動を行い、目的のDNAを切り出した。切り出したDNAを含むゲルは0.5mlのTEバッファーを加え、70℃、5分間熱処理をしてゲルを溶解した。これに0.5mlのフェノールを加えよくかくはんし、12000rpm、10分間遠心して上層を回収した。次に、0.5mlのフェノール/クロロホルム(等量混合液)を加え混合し、12000rpm、10分間遠心し水層を回収した。続いて、0.5mlのクロロホルムを加え混合し、12000rpm、10分間遠心し水層を回収した。最後に、50μlの3M酢酸ナトリウムと1mlのエタノールを加え、12000rpm、10分間遠心し沈殿を回収した。沈殿は80%エタノールにて洗浄し、乾燥後、5μlのTEバッファーに溶解した。5μgのM13mp18RF DNAを10ユニットの制限酵素HincIIで37℃、60分間反応させた後、70℃、10分間熱処理をして酵素を失活させた。この溶液に0.5ユニットのアルカリホスファターゼを加え37℃、60分間反応させた後、100μlのフェノール/クロロホルム(等量混合液)を加え混合し、12000rpm、10分間遠心し水層を回収した。次に、100μlのクロロホルムを加え緩やかに混合し、12000rpm、10分間遠心し水層を回収した。最後に、10μlの3M酢酸ナトリウムと200μlのエタノールを加え、12000rpm、10分間遠心し沈殿を回収した。沈殿は80%エタノールにて洗浄し、乾燥後、100μlのTEバッファーに溶解した。

【0033】このようにして調製した5μlの増幅DNAに50ngのM13mp18RF DNAを加え、ライゲーションキット(宝酒造社)に含まれる24μlのA液と6μlのB液を加えて16℃、30分間反応させた後、大腸菌JM109コンピテントセル(宝酒造社)100μlに加え水中、30分間放置した後、42℃、1分間熱処理し大腸菌へのプラスミドの形質転換を行った。1.5%アガロース2×YT培地プレートに100μlの形質転換したJM109、50μlの2%X-Gal、20μlの100mM IPTG及び3mlの0.7%アガロース2×YT培地を加え37℃、一晚培養した。現われた無色半透明のプラークを5μlのJM109を含む2×YT培地に接種し、37℃、5時間振とう培養した。培養後、培養液を8000rpm、15分間遠心し上清を回収した。この上清に1mlの20%PEG-2.5M NaClを加え、室温、15分間放置し、8000rpm、15分間遠心し沈殿したファージ粒子を回収した。これに100μlのTEバッファーを加え、100μlのフェノールを加えよくかくはん後、12000rpm、10分間遠心し水層を回収した。次に、100μlのフェノール/クロロホルム(等量混合液)を加え混合し、12000rpm、10分間遠心し水層を回収した。次に、100μlのクロロホルムを加え緩やかに混合し、1200

0rpm、10分間遠心し水層を回収した。最後に、10μlの3M酢酸ナトリウムと200μlのエタノールを加え、12000rpm、10分間遠心し沈殿を回収した。沈殿は80%エタノールにて洗浄し、乾燥後、50μlのTEバッファーに溶解し一本鎖ファージDNAを得た。

【0034】得られた一本鎖ファージDNAを鋳型としてサンガー法〔サンガーF.(Sanger, F.),サイエンス(Science)、第214巻、第1205頁(198

1)〕によりシーケナーゼ(Sequenase)シーケンシングキット(USB社)を用いてシーケンシングを行った。7μlの一本鎖ファージDNAに1μlのシーケンシングプライマーと2μlの反応バッファーを加え、65℃、2分間加熱後30分間かけてゆっくりと室温に戻した。この反応液に1μlの0.1M DTT、2μlの1/6希釈ラベリングミックス、0.5μlの[α-³²S] dCTP、及び2μlの1/9希釈シーケナーゼを加え室温、5分間ラベリング反応を行った。あらかじめそれぞれ2.5μlのddGTP、ddATP、ddTTP、及びddCTPを加えた4本のチューブにそれぞれ3.5μlのラベリング反応液を加え37℃、5分間ターミネーション反応を行った後、4μlの反応停止液を加えた。この反応液を6%ポリアクリルアミドゲル中で40ワット、1.5~3時間電気泳動を行った。泳動後、ゲルを乾燥し、X線フィルム(コダック社)によりオートラジオグラムを得た。オートラジオグラムより塩基配列を解析した。解析の結果、配列表の配列番号5~13で表されるそれぞれのL. 属細菌の特異的な塩基配列が得られた。

【0035】実施例2

PCR法によるL. 属細菌の検出

(1) L. 属細菌検出のためのプライマーの選定と合成
実施例1から得られた塩基配列を基にDNASISシステム(宝酒造社)を用いてそれぞれのL. 属細菌に特異的な配列及び共通な配列を解析し、配列表の配列番号14~19に示す特異的プライマー、配列番号20、21に示す共通プライマーを選定した。表6にそれぞれの菌株とスペーサー領域を含む特異的配列、特異的プライマーの関係を示した。これらのプライマーを実施例1-(2)と同様の方法で合成及び精製した。

【0036】(2) 特異的プライマーを用いたPCR法によるL. 属細菌DNAの増幅

実施例1-(1)で得た13種類のL. 属細菌のゲノムDNAを鋳型に用いて実施例1-(3)の方法でPCRを行った。プライマーとしてそれぞれ1μlの20μM

LAU1とLAK4R、LAU1とLAM3R、LAU1とLAJ3R、LAU1とLAC4R及びLAU1とLAB4Rを用いた。その結果、LAU1とLAK4Rのプライマー対により232bpのL. ヘテロヒオチ JCM1198とL. ホモヒオチ JCM1199

の遺伝子を、LAU1とLAM3Rのプライマー対により200bpのL. ヘテロヒオチイ IFO13118、13119とL. ホモヒオチイ IFO13120、13121の遺伝子を、LAU1とLAJ3Rのプライマー対により214bpのL. ジャポニカス IAM10068とL. プランタルム IAM1216の遺伝子を、LAU1とLAC4Rのプライマー対により230bpのL. カゼイ サブスピーシーズ ラムノサス IFO3532とL. カゼイ サブスピーシーズ カゼイ IFO3533の遺伝子を、LAU1とLAB4Rのプライマー対により224bpのL. スピーシーズ IFO3954とL. プレビス IFO13110の遺伝子を、LAF1とLAU3Rのプライマー対により150bpの単離株F-1の遺伝子を特異的に増幅することができた。

【0037】(3) L. 属細菌共通プライマーを用いたPCR法による増幅

それぞれ1μlの20μM LAU1とLAU3Rを用いて実施例1-(1)で得た13種のL. 属細菌のゲノムDNAを鋳型に用いて実施例1-(3)の方法でPCRを行った。その結果、165bpのL. ヘテロヒオチイ JCM1198とL. ホモヒオチイ JCM1199の遺伝子を、222bpのL. ヘテロヒオチイ IFO13118、13119とL. ホモヒオチイ IFO13120、13121の遺伝子を、153bpのL. ジャポニカス IAM10068とL. プランタルム IAM1216の遺伝子を、175bpのL. カゼイ サブスピーシーズ ラムノサス IFO3532とL. カゼイ サブスピーシーズ カゼイ IFO3533の遺伝子を、163bpのL. スピーシーズ IFO3954とL. プレビス IFO13110の遺伝子を、170bpの単離株F-1の遺伝子をすべて増幅することができ、被検菌すべての遺伝子の増幅が可能であり、電気泳動により、タイピングを行うことができた。

【0038】実施例3

L. 属細菌共通プライマーを用いた清酒における火落菌の検出

(1) サンプルの濃縮と前処理

あらかじめSI培地(日本醸造協会)プレートテストにより火落菌の有無及び菌数を調べた清酒サンプルを用いて、300ml清酒中に0、1、10、100個の火落菌の菌数になるようにモデルサンプルを調製した。300mlのサンプルを直径47mm、孔径0.45μmニトロセルロースメンブランフィルター(アドバンテック社)を用いて吸引ろ過した。このフィルターを1mlの滅菌水で洗浄し、その0.4mlをフィルター付き遠心チューブスプレック(SUPREC)-01に移し、3000rpm、10分間遠心し濃縮した。更に、残りの0.4mlを加え、同じ操作で濃縮した。フィルター上に35μlの前処理溶液[10mMトリス-HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.01%(W/V)

ゼラチン、0.1mg/mlプロテイナーゼK]を加えフィルターを洗浄し、0.5ml用チューブに移した。これに100μlのミネラルオイル(シグマ社)を上層し、37℃、1時間反応後、94℃、10分間熱処理を行った。

【0039】(2) PCR法による増幅と検出

実施例3-(1)で前処理したサンプルに15μlのPCR反応溶液[10mMトリス-HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.01%

(W/V)ゼラチン、0.67mM dNTP混合液(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、0.67μM LAU1、0.67μM LAU3R、0.08ユニット/μlタックポリメラーゼ]を加え、実施例1-(3)と同様の方法でPCRを行った。PCRのサイクルは35サイクル行った。反応後、反応液の10μlをヌービー3:1アガロース(FMC社)ゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、増幅されたDNAを検出した。その結果、火落菌が含まれていないサンプルでは増幅は認められなかったが、300ml中に、10、100個の火落菌が含まれているサンプルでは約150~200bpの増幅が認められ火落菌が検出できた。

【0040】(3) 死菌による偽陽性の回避方法

実施例3-(2)に示した300ml中にそれぞれ1、10、100個の火落菌生菌が含まれているサンプル(生菌サンプル)及び300ml中に100個の火落菌が含まれているサンプルを加熱処理(65℃、10分)して火落菌を死滅させたサンプル(死菌サンプル)を用意した。これらの各サンプル300mlをそれぞれ実施例3-(1)と同様にニトロセルロースメンブランフィルターを用いて吸引ろ過した。一方、オートクレーブ処理後、静置、放冷し、デカンテーションしてアガーの沈殿を除去して、アガーを含まないSI培地を調製した。このアガーを含まないSI培地2mlで前述のフィルターを洗浄した後、培地を試験管に移し、30℃で2日間培養した。次にこの培養培地0.4mlをスプレック-01に移し、3000rpm、10分間遠心し濃縮した。更に、0.4mlの蒸留水を加えて3000rpm、10分間遠心した。次に、実施例3-(1)と同様にフィルター上に35μlの前処理溶液を加え、実施例3-(1)の方法で前処理を行った。続いて、実施例3-(2)の方法でPCRを30サイクル行った。その結果、いずれの生菌サンプルの処理物においても増幅が認められたが、死菌サンプルの処理物では増幅は認められなかった。すなわち、本方法により死菌による偽陽性を回避することができ、且つ、生菌体1個の検出が可能であった。

【0041】実施例4

火落菌検出キットの作成

実施例3-(1)及び3-(2)に示した前処理溶液(A剤とする)、PCR反応溶液(B剤とする)、ニト

ロセルロースメンブランフィルター（直径47mm、孔径
0.45 μ m）、フィルター付遠心チューブスプレック
ー01及びヌシーブ3：1アガロースを1組として、火 *

* 落菌検出キットを構築した（表7）。

【0042】

【表7】

表7 火落菌検出キット（50回分）

ニトロセルロースメンブランフィルター （直径47mm、孔径0.45 μ m）	50枚
スプレックー01	50個
A 剤	1750 μ l（35 μ l \times 50回分）
B 剤	1750 μ l（35 μ l \times 50回分）
ヌシーブ3：1アガロース	100g

【0043】

【発明の効果】以上詳細に説明したように、本発明によ
りL. 属細菌の16S/23SrRNAスペーサー領域
の塩基配列が明らかになり、このスペーサー領域の塩基
配列を用いたL. 属細菌、特に火落菌の迅速、且つ高感
度な検出方法が提供された。

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

アンチセンス：NO

配列：

CTTGATACACA CCGCCCGTCA 20

配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

アンチセンス：NO

配列：

GTGCGGCTGG ATCACCTCCT 20

配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CTTGATACACA CCGCCCGTCA CACCATGATA GTTTGTAACA CCCAAAGTCG GTTAGGTAAC 60

TTTTGGAGCC TGCCGCCTAA GGTGGGACAG ATGATTAGG TGAAGTCGTA ACAAGGTAGC 120

CGTAGGAGAA CCTGCGGCTG GATCACCTCC TTTCTAAGGA AAAATTCGAA AACCCTACAC 180

AATTAAAGTC TTGTTTAGTT TTGAGAGTTT TACTCTCAAT ACTTTGTTCT TTGAAACTA 240

GATAATATTA TTTTCTGTAT TAATTATATT TTAATTATAA TTTTAACCGA GAAATAACCA 300

CTACGTTATT TGAGTTTTTT AAAATAGTTT AAATCGCAAA TACTCAATAA CTTACATCAC 360

GAAGTGATGC AGGTTAAGTT ATTAAGGGCG CAGGTGAAT GCCTTGGTAC TAGGAGCCGA 420

※アンチセンス：YES

配列：

CTCCTAGTGC CAAGSCATYC 20

配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

20 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

アンチセンス：YES

配列：

TCCGGGTACT TAGATGTTTC 20

配列番号：5

配列の長さ：540

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス ヘテロヒオチイ (Lactobacil
lus heterohiochii)

株名：JCM 1198

生物名：ラクトバチルス ホモヒオチイ (Lactobacillu
s homohiochii)

株名：JCM1199

配列の特徴：

1-155 16SrRNA をコードする領域

40 156-371 スペーサー領域

220 tRNAをコードする領域の挿入位置

※ 372-540 23SrRNA をコードする領域

19

20

TGAAGGACGG AACTAACACC GATATGTTTC GGGGAGCTGT ACGTAAGCTT TGATCCGAG 480
 ATTTCCGAAT GGGGAAACCC AATCATCTTA GTCGATGATT GCTCGACAGT GAATTCAGT 540

配列番号：6

配列の長さ：585

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス ヘテロヒオチイ (Lactobacillus heterohiochii)

* 株名：IF013118, IF013119

生物名：ラクトバチルス ホモヒオチイ (Lactobacillus homohiochii)

株名：IF013120, IF013121

配列の特徴：

1-162 16SrRNA をコードする領域

163-370 スペーサー領域

277 tRNAをコードする領域の挿入位置

* 371-585 23SrRNA をコードする領域

配列：

CTTGACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGCCG GCCGGATAAC 60
 CTAGTTTACT AGGAGTCAGC CGTCTAAGGT GGGACAAATG ATTAGGTGA AGTCGTAACA 120
 AGGTAGCCGT AGGAGAACCT GCGGCTGGAT CACCTCCTTT CTAAGGAAAA AAAGCGAAGC 180
 TGACGGAGAG TAGGAGACTA CTAAGAGAAG TCAGTGAAGC AAACGGAAGC ACACGAAAGA 240
 GACTTTGTTT AGTTTGGAGG GTAGTACCTC AAGAAAAGTT AGTACATTGA AACTGAATA 300
 TAATCCAAT AAAAACCGAG ACAATCATTTG AAGAACAGAT TGTAGAGCGA CCGAGAAGAG 360
 CGATCTTAAA GTAAGGTCAA GTAGACAAGG GCGCACGGTG AATGCCTAGG CACTAGCAGC 420
 CGAAGAAGGA CGTGACGAAC TACGAAAAGC TTCGGGGAGT TGTAAGTAAA CTAAGATCCG 480
 GAGATGTCCA AATGGGGAAC CCCAATGCAG TGATGCATTA TTAGTAGCCG AATAGATAGG 540
 CTGGTAAAGG AAGACGCAGT GAACTGAAAC ATCTAAGTAC CCGGA 585

配列番号：7

配列の長さ：574

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス ジャポニカス (Lactobacillus japonicus) ※30

※s japonicus)

株名：IAM10688

配列の特徴：

1-155 16SrRNA をコードする領域

156-358 スペーサー領域

224 tRNAをコードする領域の挿入位置

359-574 23SrRNA をコードする領域

配列：

CTTGACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGTCG GTGGGTAAC 60
 TTTTAGGAAC CAGCCGCTA AGGTGGGACA GATGATTAGG GTGAAGTCGT AACAAGGTAG 120
 CCGTAGAGAA CCTGCGGCTG GATCACCTCC TTTCTAAGGA ATATTACGGA AACCTACACA 180
 CGCGTCGAAA CTTTGTTTAG TTTTGAGAGA TTTAACTCTC AAAACTTGTT CTTTGAAAAC 240
 TAGATAATAT CAAATATATT TTTTCATAAT GAAACCGAGA ACACCGCGTT TTTTGAGTTT 300
 TTTATTGAAG TTTAATTATC GCTAAACTCA TTAATCGCAT TTACCGTTAG GTAAATGAGG 360
 TTAAGTTAAC AAGGGCGCAT GGTGAATGCC TTGGCACTAG GAGCCGATGA AGGACGGGAC 420
 TAACACCGAT ATGCTTCGGG GAGCTGTACG TAAGCTATGA TCCGGAGATT TCCGAATGGG 480
 GCAACCCAGC AGTTTAAATC AACTGTTACC ACTAGATGAA TTCATAGTCT AGTTGGAGGT 540
 AAACGCTGTG AACTGAAACA TCTAAGTACC CGGA 574

配列番号：8

配列の長さ：574

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス プランタルム (Lactobacillus plantarum) ★

★s plantarum)

株名：IAM1216

配列の特徴：

1-155 16SrRNA をコードする領域

156-358 スペーサー領域

224 tRNAをコードする領域の挿入位置

359-574 23SrRNA をコードする領域

配列：

CTTGACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGTCG GTGGGTAAC 60

21

22

TTTTAGGAAC CAGCCGCCTA AGGTGGGACA GATGATTAGG GTGAAGTCGT AACAAAGTAG 120
 CCGTAGAGAA CCTGCCGCTG GATCACTCC TTTCTAAGGA ATATTACGA AACCTACACA 180
 CGCGTCGAAA CTTTGTTTCTAG TTTTGAGAGA TTAACTCTC AAAACTTGT CTTGAAAAC 240
 TAGATAATAT CAAATATATT TTTTCATAAT GAAACCGAGA ACACCGCGTT TTTGAGTTT 300
 TTTATTGAAG TTAAATTATC GCTAAACTCA TTAATCGCAT TTACCGTTAG GTAAATGAGG 360
 TTAAGTTAAC AAGGGCGCAT GGTGAATGCC TTGGCACTAG GAGCCGATGA AGGACGGGAC 420
 TAACACCGAT ATGCTTCGGG GAGCTGTACG TAAGCTATGA TCCGGAGATT TCCGAATGGG 480
 GCAACCCAGC AGTTTAAATC AACTGTTACC ACTAGATGAA TTCATAGTCT AGTTGGAGGT 540
 AAACGCTGTG AACTGAAACA TCTAAGTACC CGGA 574

配列番号：9

配列の長さ：588

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス カゼイ サブスピーシーズ *

* カゼイ (Lactobacillus casei subsp. rhamnosus)

株名：IFO3532

配列の特徴：

1-158 16SrRNA をコードする領域

159-375 スペーサー領域

250 tRNAをコードする領域の挿入位置

376-588 23SrRNA をコードする領域

配列：

CTTGACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCGAAGCCG GTGGCGTAAC 60
 CTTTATAGGA GCGAGCCGTC TAAGGTGGGA CAAATGATTA GGGTGAAGTC GTAACAAGGT 120
 AGCCGTAGGA GAACCTGCGG CTGGATCACC TCCTTTCTAA GGAAACAGAC TGAAAGTCTG 180
 ACGGAAACCT GCACACACGA AACTTTGTTT AGTTTGGAGG GGATCACCCCT CAAGCACCCCT 240
 AACGGGTGCG ACTTTGTTCT TTGAAAACCTG GATATCATTG TATTAATTGT TTTAAATTGC 300
 CGAGAACACA GCGTATTTGT ATGAGTTTCT GAAAAAGAAA TTCGCATCGC ATAACCGCTG 360
 ACGCAAGTCA GTACAGGTTA AGTTACAAAG GGCGCACGGT GGATGCCTTG GCACTAGGAG 420
 CCGATGAAGG ACGGAACTAA TACCGATATG CTTCGGGGAG CTATAAGTAA GCTTTGATCC 480
 GGAGATTTC GAATGGGGGA ACCCAGTACA CATCAGTGTG TTGCTTGTC GTGAATACAT 540
 AGCTGGCCGG CGGCAGACGC GGGGAACTGA AACATCTAAG TACCCGGA 588

配列番号：10

配列の長さ：588

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス カゼイ サブスピーシーズ ※

※カゼイ (Lactobacillus casei subsp. casei)

30 株名：IFO3533

配列の特徴：

1-158 16SrRNA をコードする領域

159-375 スペーサー領域

250 tRNAをコードする領域の挿入位置

376-588 23SrRNA をコードする領域

配列：

CTTGACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCGAAGCCG GTGGCGTAAC 60
 CTTTATAGGA GCGAGCCGTC TAAGGTGGGA CAAATGATTA GGGTGAAGTC GTAACAAGGT 120
 AGCCGTAGGA GAACCTGCGG CTGGATCACC TCCTTTCTAA GGAAACAGAC TGAAAGTCTG 180
 ACGGAAACCT GCACACACGA AACTTTGTTT AGTTTGGAGG GGATCACCCCT CAAGCACCCCT 240
 AGCGGGTGCG ACTTTGTTCT TTGAAAACCTG GATATCATTG TATTAATTGT TTTAAATTGC 300
 CGAGAACACA GCGTATTTGT ATGAGTTTCT GAAAAAGAAA TTCGCATCGC ATAACCGCTG 360
 ACGCAAGTCA GTACAGGTTA AGTTACAAAG GGCGCACGGT GGATGCCTTG GCACTAGGAG 420
 CCGATGAAGG ACGGAACTAA TACCGATATG CTTCGGGGAG CTATAAGTAA GCTTTGATCC 480
 GGAGATTTC GAATGGGGGA ACCCAGTACA CATCAGTGTG TTGCTTGTC GTGAATACAT 540
 AGCTGGCCGG CGGCAGACGC GGGGAACTGA AACATCTAAG TACCCGGA 588

配列番号：11

配列の長さ：414

配列の型：核酸

★鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

★50 配列の種類：genomic DNA

23

24

起源：

生物名：ラクトバチルス スピーシーズ (Lactobacillus sp.)

株名：IF03934

配列の特徴：

* 1-156 16SrRNA をコードする領域

157-370 スペーサー領域

225 tRNAをコードする領域の挿入位置

371-414 23SrRNA をコードする領域

*

配列：

CTTGATACACA CCGCCCGTCA CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGCCG GTGAGATAAC 60
 CTTCCGGAGT CAGCCGTCTA AGGTGGGACA GATGATTAGG GTGAAGTCGT AACAAAGGTAG 120
 CCGTAGGAGA ACCTGCGGCT GGATCACCTC CTTTCTAAGG AATATACGGA GGCTACACAT 180
 ACTTGTTGAA ACAATGTTCA GTTTTGAGGG GCTTACCTCT CTAAACTTGT TCTTTGAAAA 240
 CTAGATATTA TCAATTATTT TCCTTTAATT ATTAAGATAA TTAAACCGAG AAACAACCTGC 300
 GTATTTTGA GTTTTAAAT TAGTTTATCG CTAATACTCA ATTAATTGA CGATCACGAA 360
 GTGACCGTTA GGTAAAGTTA TGAAGGGCGC ATGGTGGAGC CTTGGTACTA GGAG 414

配列番号：12

配列の長さ：585

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

生物名：ラクトバチルス プレビス (Lactobacillus br ※

※evis)

株名：IF013110

配列の特徴：

1-156 16SrRNA をコードする領域

157-370 スペーサー領域

225 tRNAをコードする領域の挿入位置

20 371-585 23SrRNA をコードする領域

配列：

CTTGATACACA CCGCCCGTCA CACCACGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGCCG GTGAGATAAC 60
 CTTCCGGAGT CAGCCGTCTA AGGTGGGACA GATGATTAGG GTGAAGTCGT AACAAAGGTAG 120
 CCGTAGGAGA ACCTGCGGCT GGATCACCTC CTTTCTAAGG AATATACGGA GGCTACACAT 180
 ACTTGTTGAA ACAATGTTCA GTTTTGAGGG GCTTACCTCT CTAAACTTGT TCTTTGAAAA 240
 CTAGATATTA TCAATTATTT TCCTTTAATT ATTAAGATAA TTAAACCGAG AAACAACCTGC 300
 GTATTTTGA GTTTTAAAT TAGTTTATCG CTAATACTCA ATTAATTGA CGATCACGAA 360
 GTGACCGTTA GGTAAAGTTA TGAAGGGCGC ATGGTGGATG CTTGGTACT AGGAGCCGAT 420
 GAAGGACGGG ACTAACACCG ATATGCTTCG GGGAGCTGTA CGTAAGCTTT GATCCGGAGA 480
 TTTCCGAATG GGGAAACCCA ATCATCTTTA CCGATGATTA CAACTTGATG AATACATAGT 540
 CAAGTTGAGG CAGACGTGGG GAACTGAAAC ATCTAAGTAC CCGGA 585

配列番号：13

配列の長さ：286

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源：

★生物名：ラクトバチルス (Lactobacillus)

株名：F-1

配列の特徴：

1-20 16SrRNAをコードする領域

21-241 スペーサー領域

86 tRNAをコードする領域の挿入位置

★ 242-286 23SrRNA をコードする領域

配列：

GGCTGGATCA CCTCCTTCT AAGGAAAATT CGGAAACCTA CACAATGTCG AAAGTTTGT 60
 TCAGTTTGA GAGGTCTACT CTCAAACTTG GTTCTTTGAA AACTAGATAA TATTAATTTT 120
 CTGAATTTA TTGAATTGGA TATAATCCAA TTTCAACCGA GAACACCGCG TTATTTTGAG 180
 TTTGTAACT AAGTAAAAA TCGCAAATAC TCAATTAAT AAAGTATCCG TAGGATACTT 240
 AGGTAAAGTT ATCAAGGGCG CATGGTGAAT GCCTGGGCAC TAGGAG 286

配列番号：14

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆配列の種類：他の核酸 (合成DNA)

アンチセンス：YES

配列：

CCTGCATCAC TTCGTGATGT 20

☆50 配列番号：15

25

配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 アンチセンス：YES
 配列：
 GCTCTACAAT CTGTTCTTCA 20
 配列番号：16
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 アンチセンス：YES
 配列：
 TTTACCTAAC GGTAAATCGG 20
 配列番号：17
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸（合成DNA）
 アンチセンス：YES
 配列：
 GTACTGACTT GCGTCAGCGG 20
 配列番号：18
 配列の長さ：20
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状

26

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

アンチセンス：YES

配列：

GGTCACTTCG TGATCGTCAA 20

配列番号：19

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

アンチセンス：NO

配列：

AATTCGGAAA CCTACACAAT 20

配列番号：20

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20 アンチセンス：NO

配列：

ATCACCTCCT TTCTAAGGAA 20

配列番号：21

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

アンチセンス：NO

30 配列：

* AAAAAACGCG GTGTTCTCGG 20

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

C 1 2 Q 1/68

識別記号

庁内整理番号

Z 7823-4B

F I

技術表示箇所